

CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINAS EM HÍBRIDOS DE MILHO CULTIVADOS EM TRÊS REGIÕES DO ESTADO DE GOIÁS¹

Cristiane Regina Bueno Aguirre Ramos², Edward Madureira Brasil³,
Robson Maia Geraldine³

ABSTRACT

AFLATOXINS CONTAMINATION OF CORN HYBRIDS
IN THREE REGIONS OF THE GOIÁS STATE, BRAZIL

The natural occurrence of aflatoxins B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), and G₂ (AFG₂) in corn grains was evaluated in three locations of Goiás State (Jataí, Montividiu and Goiânia), from twelve grain samples of hybrids (DAS766, DAS657, 30K75, 30F44, 30P70, 30F33, AG7000, DKB350, AG1051, Strike, Speed and Fort). The aflatoxins were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The results were related to the temperature and rainfall data from each region, and to the presence of fungi and rotten ears in the samples. The lowest percentage of rotten ears occurred in Goiânia, with a significant difference among the hybrids. The pathological analysis of the seeds was determined by the "Blotter" test. The *Aspergillus* spp. was present in all the samples from Jataí, in 41.7% of the samples from Goiânia, and a single sample from Montividiu. The aflatoxin contamination was higher in the samples from Jataí, followed by Goiânia and Montividiu, respectively. In Jataí, that result was correlated with higher rainfall levels during harvest. The levels of AFB₁ ranged between "not detected" (nd) and 277.8 µg.kg⁻¹; 0.7 µg.kg⁻¹, and 14 µg.kg⁻¹, for AFB₂; and between nd and 34.1 µg.kg⁻¹, for AFG₂. The AFG₁ was not detected in any of the samples.

KEY-WORDS: Rotten ear; *Aspergillus* spp.; aflatoxin; maize; HPLC.

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas foram descobertas em 1960, devido à morte de perus na Europa, pela alimentação com torta de amendoim contaminado por *Aspergillus flavus* (Jones 1977). A partir de então, tal contaminação vem sendo estudada e relatada em grande número de produtos agrícolas, tais como amendoim, milho, castanha, arroz, feijão, rações animais e outros.

RESUMO

A ocorrência natural de aflatoxinas G₁(AFG₁), G₂ (AFG₂), B₁ (AFB₁) e B₂ (AFB₂) em grãos de milho foi avaliada em três locais do Estado de Goiás (Jataí, Montividiu e Goiânia), a partir de amostras de doze híbridos (DAS766, DAS657, 30K75, 30F44, 30P70, 30F33, AG7000, DKB350, AG1051, Strike, Speed e Fort). A análise de aflatoxinas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), correlacionando-se os resultados com dados de temperatura e chuvas nas regiões, e com a presença de fungos e grãos ardidos nas amostras. Em Goiânia, verificou-se a menor ocorrência de grãos ardidos, havendo diferença significativa entre os híbridos. A análise patológica dos grãos foi realizada pelo teste "Blotter". Detectou-se a presença de *Aspergillus* spp. em todas as amostras provenientes de Jataí, em 41,7% das amostras de Goiânia e em apenas uma amostra de Montividiu. O local onde houve maior contaminação por aflatoxinas foi Jataí, seguido de Goiânia e Montividiu, respectivamente. Em Jataí, esse resultado foi correlacionado com a maior quantidade de chuvas durante a colheita. Os níveis de contaminação variaram entre "não detectada" (nd) e 277,8 µg.kg⁻¹, para AFB₁; de 0,7 µg.kg⁻¹ a 14 µg.kg⁻¹, para AFB₂; e de nd a 34,1 µg.kg⁻¹, para AFG₂. Não foi detectada a aflatoxina G₁ em quaisquer das amostras analisadas.

PALAVRAS-CHAVE: Grãos ardidos; *Aspergillus* spp.; aflatoxinas; milho; CLAE.

Entre as micotoxinas já estudadas, as aflatoxinas são as mais carcinogênicas. Mesmo alimentos contaminados com baixos teores dessas micotoxinas, se ingeridos com frequência e por tempo prolongado, podem levar ao aparecimento de carcinoma hepático. Entretanto, a ingestão de alimentos com alto grau de contaminação produz, em geral, a curto prazo, efeitos agudos, caracteristicamente hepatotóxicos, como necrose e degeneração gordurosa, que recebem a denominação de aflatoxicose (Peers et al. 1985).

1. Parte da tese de doutorado da primeira autora, apresentada à Universidade Federal de Goiás (UFG), Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Trabalho recebido em jan./2006 e aceito para publicação em mar./2008 (nº de registro: PAT 685).

2. Rua GV 05, Quadra 13, Lote 24, Granville, Goiânia. E-mail: cris.bueno@brturbo.com.br.

3. Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos. Av. Goiânia-Nova Veneza, km 0, Campus Samambaia, CEP 74001-970 Goiânia, GO. E-mails: ebrazil@agro.ufg.br, robson.agro.ufg@gmail.com.

As aflatoxinas têm grande importância na cultura do milho, pois este está presente em grande parte da ração animal. Animais que se alimentam de ração contaminada podem ter a ocorrência de aflatoxinas em seus fluidos, principalmente o leite de vaca. Se estas substâncias estiverem presentes no leite, estarão também nos seus produtos derivados, como queijo, requeijão, iogurte etc. Segundo Prandini et al. (2007), ainda não foram desenvolvidos híbridos resistentes à contaminação por aflatoxinas.

No Estado de Goiás, vem aumentando, ano após ano, a área plantada com milho, que é cultivado, praticamente, em toda a sua extensão. Desse modo, o presente trabalho objetivou avaliar a ocorrência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, em grãos de milho provenientes de híbridos cultivados em três localidades dessa importante região produtora de milho no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos, na safra 2002/2003, três ensaios, nos municípios de Jataí (latitude 17°52'53", longitude 51°42'52" e altitude 696m), Montividiu (latitude 17°19'00", longitude 51°15'00" e altitude 821m) e Goiânia (latitude 16°41'00", longitude 49°16'00" e altitude 610m). Estes municípios representam importantes regiões produtoras de milho no Estado de Goiás e no Brasil. Dados de precipitação pluviométrica e de temperatura foram coletados em estações meteorológicas de cada localidade.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com quatro repetições, e doze híbridos (DAS657, DAS766, 30K75, 30P70, 30F44, 30F33, AG1051, AG7000, DKB350, Speed, Strike e Fort). Cada parcela foi composta de quatro linhas de 5,0 m de comprimento, sendo colhidas as duas linhas centrais. O espaçamento entre plantas variou de acordo com o local. Em Goiânia, o espaçamento entre linhas foi de 0,90 m; em Montividiu, 0,80 m; e em Jataí, 0,62 m, obtendo-se uma população final de 60 mil plantas.ha⁻¹, em todos os locais.

Foram feitas colheita e despalhamento manuais das espigas, seguindo-se a debulha em debulhador elétrico. Após a colheita, o milho foi seco ao sol, até atingir a umidade de 13%. Depois de seco, os grãos foram homogeneizados, retirando-se uma amostra de 2,0 kg da produção de cada parcela, a qual foi enviada para análises laboratoriais. As análises de grãos

ardidos e de patologia de sementes foram realizadas logo após a colheita. Para análise do teor de aflatoxinas, os grãos foram previamente mantidos em câmara fria, até o momento da moagem.

A porcentagem de grãos ardidos foi obtida pela separação manual de grãos sintomáticos (ardidos), em amostra de 250 g de grãos de cada parcela (Brasil, 1996). Os grãos ardidos foram pesados e o peso obtido foi transformado em porcentagem. Consideraram-se ardidos, os grãos inteiros ou em pedaços, danificados por fungos, deteriorados e, ou, aquecidos microbiologicamente (Lazzari & Lazzari, 2001).

As análises da microbiota fúngica foram realizadas utilizando-se o método do papel de filtro ("Blotter Test"). Os grãos foram dispostos em número de vinte por recipiente (Gerbox), com dez repetições. Em seguida, os recipientes contendo os grãos foram mantidos, por 24 horas, à temperatura de 25°C (temperatura de incubação); a seguir, por 24 horas a -18°C, transferindo-os, após este período, para ambiente controlado, sob temperatura de, aproximadamente, 25°C, sob luz ultra violeta, em turnos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, por um período de sete dias. Após esse período, os grãos foram examinados um a um, sob microscópio estereoscópio, e foi realizada a identificação e a quantificação dos fungos existentes, baseando-se na estrutura reprodutiva do fungo (Brasil 1992).

Para análise de aflatoxinas, realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, em Inglês), 500g de grãos foram triturados em moinho elétrico, com peneira de 425 mm e, então, conservados em *freezer* até o procedimento das análises. Para avaliar a porcentagem de recuperação do método, analisaram-se, previamente, seis amostras, as quais foram contaminadas, posteriormente, com volume conhecido de cada aflatoxina, em 50g, e procedendo-se novamente à análise. Com relação ao limite de detecção e de quantificação, foram preparadas as soluções com um *pool* de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e feita a curva padrão, injetando-se 40 ng, 20 ng, 16 ng, 10 ng, 5 ng e 1 ng.

A extração, limpeza e purificação de aflatoxinas foi feita de acordo com metodologia de Jorge (2004)¹. Foram pesados 50 g da amostra, previamente triturada, e adicionados 200 mL de solução metanol/água (70:30

¹ Roberto Montero Jorge, pesquisador pleno do Laboratório de Contaminantes e Autenticidade – Nestlé do Brasil Ltda. Rua Guido Caloi, n.1935, piso 3, bloco A, Jardim São Luiz - São Paulo - SP (Comunicação pessoal). 2004.

v/v), como solvente extrator, sendo mantidos sob agitação durante trinta minutos.

Para a limpeza da amostra, as alíquotas provenientes do processo de extração foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 4. Posteriormente, tomou-se uma alíquota de 100 mL do material filtrado e adicionaram-se 100 mL de solução de sulfato de cobre II, a 10% (m/v), e 3 g de celite. Agitou-se esta solução por dois minutos e, então, a mesma foi filtrada novamente, em papel de filtro (Whatman nº4). Uma alíquota de 100 mL deste filtrado foi colocada em funil de separação, onde se adicionaram 100 mL de água destilada.

A seguir, adicionaram-se 20 mL de clorofórmio ao funil de separação, agitando-se a mistura, manualmente, durante dois minutos, e deixando-a em repouso para separação das fases. O extrato clorofórmico foi coletado em frasco de vidro âmbar, sendo este procedimento repetido por mais duas vezes. Estes extratos foram evaporados até secura ou resíduo. O extrato seco foi armazenado, à temperatura de -4°C, por, no máximo, três dias, antes de ser analisado. Posteriormente, o extrato foi ressuspenso em 20 mL da fase móvel e filtrado em membrana hidrofílica 0,45 µm (Milipore).

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Varian ProStar Dynamax), com duas bombas (modelo 210) e injetor manual. Foi utilizado detector de fluorescência (modelo 363, Varian), comprimento de onda de 365 nm para excitação e 428 nm para emissão. Realizou-se derivatização pós-coluna, utilizando-se solução saturada de iodo. A solução derivatizante foi preparada com 1,0 g de iodo, em 20 mL de metanol e 200 mL de água Milli-Q, sendo aquecida a 40°C, sob agitação constante, por trinta minutos. A solução foi, então, filtrada em membrana hidrofílica 0,45 µm (Milipore) e degaseificada em ultrassom (modelo D-409X ADTI – CTA do Brasil Ltda., 40 khz de frequência), durante quarenta minutos. Utilizou-se coluna C18 – fase reversa (Microsorb-MV, Varian), 250 mm x 4,6 mm, sendo mantida em banho-maria, à temperatura de 75°C. Uma conexão em forma de "T" foi colocada após a coluna, promovendo o contato do efluente com a solução derivatizante, que, durante a passagem pelo tubo em espiral (*coil*), possibilitou a derivatização das aflatoxinas B₁ e G₁. O *coil* (1.000 mm x 0,3 mm) também foi mantido em banho-maria (75°C) (Figura 1). A fase móvel utilizada foi 60% de

água pura (Milli-Q), 35% de metanol (grau CLAE) e 5% de acetonitrila (grau CLAE). Para análise, foram injetadas alíquotas de 100 µL da amostra ressuspenso. O fluxo foi de 0,9 mL/min., para a fase móvel, e 0,3 mL/min., para a solução de iodo.

Os padrões de aflatoxinas utilizados foram obtidos da Sigma Chemical Co. (EUA) e o preparo das soluções padrão-estoque foi realizado segundo o método descrito na Instrução Normativa nº 9 (24 de março de 2000), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil 2000).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e a avaliação das diferenças entre os híbridos e os locais de plantio foi realizada pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. As análises foram implementadas no aplicativo Sanest (Zonta & Machado 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Grãos ardidos

Na análise conjunta dos dados, verificou-se que a menor incidência ($p < 0,05$) de grãos ardidos ocorreu no município de Goiânia, sendo que, nos municípios de Jataí e Montividiu, os valores foram semelhantes entre si (Figura 2). Provavelmente, a maior incidência de chuvas após o florescimento e, principalmente, durante o período de floração, em Jataí e Montividiu, relativamente a Goiânia, tenha sido responsável por esse resultado (Figuras 3, 4 e 5). Constatou-se, também, que houve interação significativa entre locais e híbridos, indicando que os híbridos se comportaram diferentemente em cada local cultivado.

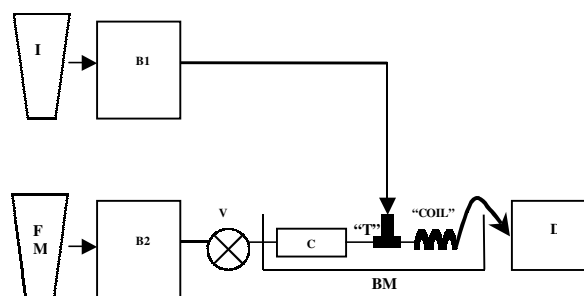


Figura 1. Diagrama do sistema CLAE para determinação de aflatoxinas com derivatização pós-coluna com iodo (I: iodo; FM: fase móvel; B1 e B2: bombas; V: válvula de injeção; C: coluna C18; BM: banho-maria à 75°C; D: detector de fluorescência).

Segundo Santurio (1997), a maioria das agroindústrias produtoras de frangos e suínos têm, como tolerância máxima, o nível de até 6% de grãos ardidos, chegando-se até a bonificar o fornecedor a cada ponto percentual abaixo deste limite. No município de Goiânia, os valores de grãos ardidos variaram entre 1,1% e 5,4% (Figura 2), portanto, abaixo do índice aceito nas indústrias. Assim, os híbridos com maior incidência neste local foram AG1051 (5,4%) e AG7000 (5,1%); e os de menor incidência foram 30P70 (1,1%), DAS657 (1,1%), 30F44 (1,4%) e Strike (1,8%).

Em Montividiu, a incidência de grãos ardidos variou entre 3,9% e 7,2%, sendo que 66,7% das amostras apresentaram valores superiores a 6% (Figura 2). O híbrido que apresentou a maior incidência foi AG1051 (7,2%), e o de menor incidência foi 30F44 (3,9%). Pôde-se observar que, tanto em Montividiu quanto em Goiânia, o híbrido AG1051 apresentou alta porcentagem de grãos ardidos, e 30F44 esteve entre os que apresentaram menor incidência desses grãos, em ambos os locais.

No município de Jataí, os valores de grãos ardidos variaram entre 4,6% e 9,4%, sendo que 83,3% das amostras apresentaram valores acima de 6% (Figura 2). O híbrido que apresentou a maior incidência foi Speed (9,4%) e o de menor incidência foi 30P70 (4,6%). Tanto em Goiânia, como em Jataí, o híbrido 30P70 foi também o que apresentou a menor incidência de grãos ardidos.

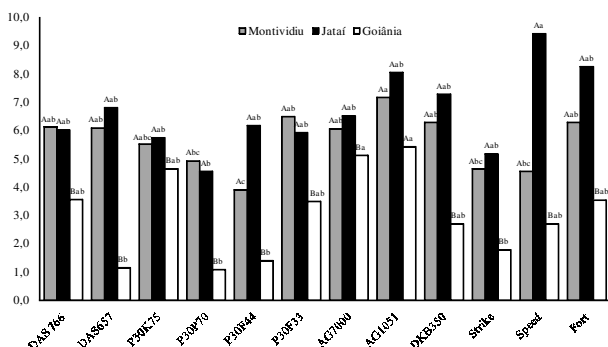


Figura 2. Incidência de grãos ardidos em híbridos de milho provenientes dos municípios de Goiânia, Montividiu e Jataí, no Estado de Goiás (safra 2002/2003). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si em nível de significância de 5%, pelo teste Tukey (letras maiúsculas comparam as localidades, e as minúsculas, os híbridos).

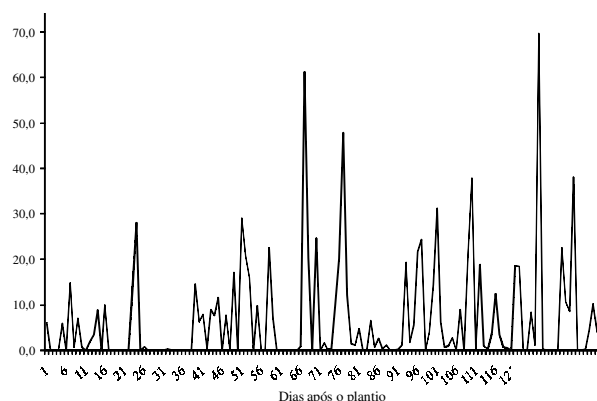


Figura 3. Índice pluviométrico diário (mm), do plantio à colheita, em Jataí (safra 2002/2003).

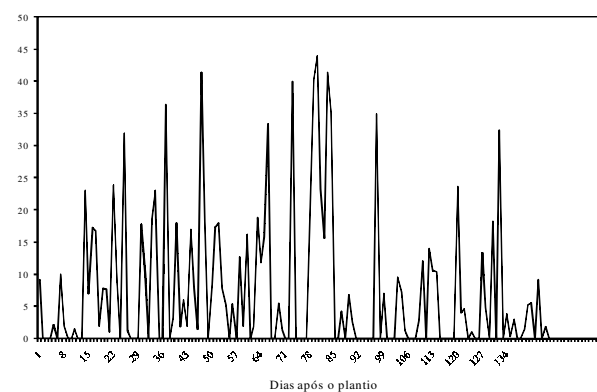


Figura 4. Índice pluviométrico diário (mm), do plantio à colheita, em Goiânia (safra 2002/2003).

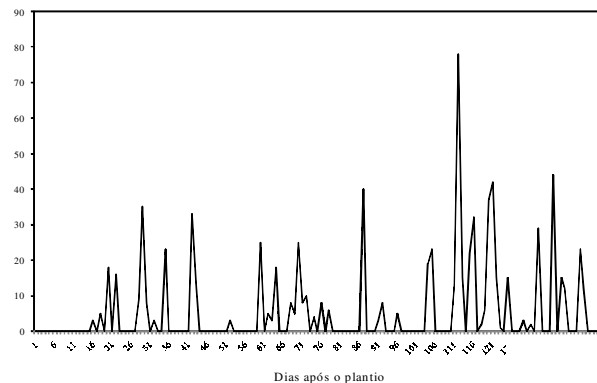


Figura 5. Índice pluviométrico diário (mm), do plantio à colheita, em Montividiu (safra 2002/2003).

Análise Patológica

Foi detectado *Aspergillus* spp. em todas as amostras provenientes do município de Jataí. A presença de aflatoxinas nestas amostras (Tabela 1) sugere que os microrganismos encontrados sejam per-

tencentos às espécies *A. flavus* e, ou, *A. parasiticus*. Em Goiânia, 41,7% das amostras estavam contaminadas com *Aspergillus* spp., e em Montividiu, apenas uma amostra apresentou o fungo. Tanto em Goiânia como em Montividiu, apesar da não detecção do fungo em algumas amostras, várias apresentaram aflatoxinas. Isso é indicativo de que, possivelmente, nas lavouras destes municípios, o fungo esteve presente nos grãos de milho em algum momento do seu ciclo de produção.

Aflatoxinas

Os limites de detecção para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram, respectivamente, 1,5 ng, 1,6 ng, 1,5 ng e 2 ng. Na análise cromatográfica, verificou-se a ocorrência de aflatoxinas em todos os locais estudados, sendo as maiores contaminações encontradas em Jataí e as menores em Montividiu ($p < 0,05$). Neste local, todas as amostras analisadas apresentaram contaminação, variando entre 0,75 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e 280,29 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflatoxinas totais (AFtotal), sendo que metade delas apresentou teor de aflatoxinas totais acima do limite aceitável pela legislação vigente (Brasil 2000), que é de 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Tabela 1). Em Goiânia, 66,7% das amostras apresentaram algum grau de contaminação, atingindo até 36,20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFtotal, mas apenas o híbrido DAS766 apresentou valor superior a 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Em Montividiu, 41,7% das amostras continham aflatoxinas, com contaminação máxima de 15,25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFtotal (Figura 6). Não foi detectada a presença de AFG₁ em quaisquer das amostras analisadas (Tabela 1).

Em Jataí, 91,7% das amostras continham aflatoxina B₁ (AFB₁), 67% continham aflatoxina B₂ (AFB₂) e 17% aflatoxina G₂ (AFG₂). Apenas o híbrido

30F44 não apresentou AFB₁. Em Goiânia, 25% das amostras analisadas estavam contaminadas por AFB₁, 25% por AFB₂ e 42% por AFG₂. No município de Montividiu, 25% das amostras estavam contaminadas por AFB₁, 16,7% por AFB₂ e 33% por AFG₂. Não houve diferença significativa entre os híbridos testados, mas pôde-se observar uma tendência de maior contaminação nos híbridos DAS766 e Strike, em todos os locais analisados.

Apesar da maior incidência de *Aspergillus* spp. nas amostras provenientes de Jataí, e maior contaminação por aflatoxinas, não foi encontrada correlação entre a incidência do fungo e o nível de aflatoxinas. Segundo Scott & Zummo (1990) e Zuber & Lillehoj (1979), genótipos resistentes a *A. flavus* podem apresentar produção de aflatoxinas, mostrando resultados divergentes, de acordo com o local e o ano analisados. Os principais fatores que levam a essa variabilidade são o método de amostragem, método de infecção (natural ou inóculo) e fatores ambientais de um dado local e ano. Portanto, segundo

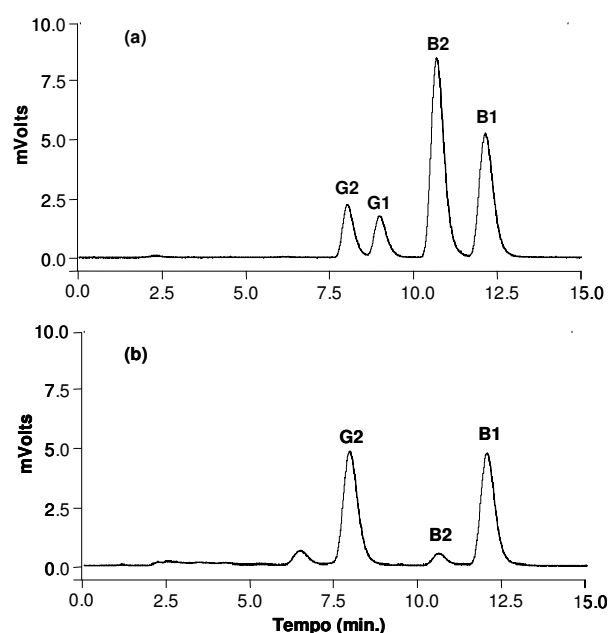


Figura 6. Cromatograma de amostra de milho, artificialmente contaminada com 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflatoxinas (a) e naturalmente contaminada (b). Condições cromatográficas: coluna C-18 (250 mm x 4,6 mm), Varian, empacotada com Microsorb-MV 5,0 μm ODS de fase reversa; fase móvel composta por 60% de água, 35% de metanol e 5% de acetonitrila; comprimento de onda de 365 nm para excitação e 428 nm para emissão; fluxo 0,9 mL/min; derivatização pós-coluna com iodo com fluxo de 0,3 mL/min.

Tabela 1. Níveis de aflatoxinas ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) presentes em grãos de híbridos de milho provenientes dos municípios de Jataí, Montividiu e Goiânia, Estado de Goiás (2002/2003).

Híbrido	Jataí			Montividiu			Goiânia		
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₂	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₂	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₂
DAS766	277,8	2,5	nd	14,0	0,7	0,5	33,4	2,8	nd
Strike	214,5	14,0	nd	3,2	0,2	0,9	10,2	0,8	nd
30P70	97,6	8,6	nd	Nd	nd	2,5	9,1	0,8	nd
DKB350	85,4	5,2	nd	Nd	nd	2,3	nd	nd	3,3
AG1051	12,1	0,8	34,1	1,3	nd	nd	nd	nd	1,6
DAS657	18,5	0,8	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	1,5
30K75	8,7	0,7	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	1,3
30F44	nd	nd	3,5	Nd	nd	nd	nd	nd	1,1
AG7000	1,7	0,2	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd
Speed	1,9	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd
30F33	0,8	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fort	0,7	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	nd

os autores, não é possível afirmar que híbridos que não produziram aflatoxinas em uma safra, não a produzirão em outros anos ou locais. Isso é concordante com o que se observou no presente estudo, pois não houve um padrão de contaminação nos diferentes locais analisados.

Segundo Lillehoj et al. (1980), estudos realizados nos Estados Unidos demonstraram que nenhum cultivar tem apresentado resistência completa, quanto à produção de aflatoxinas, havendo uma variação ampla dos valores encontrados nas amostras. No entanto, a resistência do híbrido à contaminação está ligada a alguns fatores que caracterizam esta resistência: endosperma rico em lisina ou amilose, presença de hidroxamatos cíclicos e fenóis (Hammerschmidt & Nicholson 1977, Klun et al. 1970), inibidor de tripsina (Chen & Mitchell 1973), conteúdo de voláteis C6-C12 (Zeringue 1997), superfície do grão (Brown et al. 1993, Guo et al. 1998) e inibidores de proteínas (Huang et al. 1997, Guo et al. 1996).

Houve alta correlação entre os níveis de AFB₁ e AFB₂ dentro de cada local, sendo que os maiores valores foram encontrados em Goiânia e Montividiu ($r = 0,99^*$). Esse resultado foi semelhante aos encontrados por Marín et al. (2001).

Maior percentual de amostras contaminadas foi observado neste estudo, em relação aos estudos realizados no Sul do Brasil, porém, com teores de contaminação inferiores. Analisando amostras de milho do Estado do Rio Grande do Sul, Santurio et al. (1992) observaram 28,9% de amostras contaminadas por aflatoxinas, encontrando valores de até 1.906 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, e Hennigen & Dick (1995) observaram aflatoxinas em 34,8% delas, em níveis variando de 12 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a 906 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Gunther et al. (2002), em Santa Catarina, encontraram 12% de amostras contaminadas, duas em nível de traços, destinadas ao consumo humano, e uma amostra com 128,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, para consumo animal.

Pode-se observar semelhança, quanto ao percentual de amostras contaminadas encontrado no presente estudo, com o encontrado no Estado de São Paulo. Sabino et al. (1989) encontraram valores variando de 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a 148 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, e Glória et al. (1997), analisando amostras de milho utilizado na indústria alimentícia, encontraram 57,3% de amostras contaminadas, com valor médio de 14,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Mackinski Júnior (2000) encontrou 54,5% de amostras contaminadas, mas com teores de contaminação

superiores àqueles encontrados neste estudo, variando de 6,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a 1.792 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

No Estado de Goiás, Oliveira (1997) analisou rações para galinha, encontrando apenas uma amostra contaminada, entre sessenta analisadas, com valor de 28 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Nos Estados Unidos, Abbas et al. (2006) analisaram amostras de milho colhidas em 1998, 1999 e 2001, encontrando 100% de contaminação nas amostras, com valores variando de 21 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a 699 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, em 1998; 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a 255,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, em 1999; e 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a 70,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, em 2001.

A temperatura média em Goiânia foi superior à dos dois outros locais, registrando valor médio de 30,6°C, durante todo período de cultivo. Valores menores foram registrados em Jataí, cerca de 25,9°C, e em Montividiu, 22,9°C (Figura 7).

Vários estudos na literatura demonstram que a temperatura elevada é o principal fator responsável pelo aumento de aflatoxinas em milho (Karanaratne et al. 1990, Lillehoj et al. 1975, 1980, Payne et al. 1988, Ramakrishna et al. 1990, Schmitt & Hurburgh 1989, Thompson et al. 1980, Viquez et al. 1994, Zuber & Lillehoj 1979). Jones et al. (1980) e Payne et al. (1988) demonstraram que o máximo de contaminação por *A. flavus*, em sementes de milho, ocorre em temperaturas de 30°C a 38°C. Porém, no presente estudo, o local Jataí, apesar de apresentar temperatura média abaixo da registrada em Goiânia, foi onde ocorreu a maior contaminação por aflatoxinas (Figura 7).

Observando-se os índices pluviométricos diários (Figuras 3, 4 e 5), nos três locais, pôde-se verificar que, em Goiânia e Jataí, as chuvas foram constantes durante e após o florescimento, o que

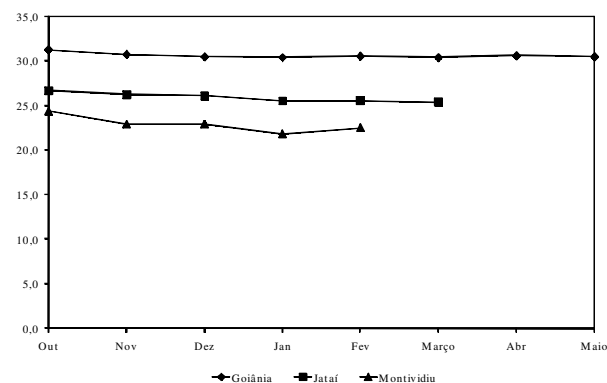


Figura 7. Temperatura média (°C), do plantio à colheita, em Jataí, Montividiu e Goiânia (safra 2002/2003).

ocorreu entre 65 e 75 dias após o plantio (DAP), em todos os locais. Em Jataí, embora a chuva tenha se estendido ao longo de todo o período, choveu 28% a mais que em Goiânia e 19% a mais que em Montividiu, entre o início do florescimento e a colheita, e, inclusive, durante a colheita. Já em Montividiu, houve pouca chuva durante o período de florescimento. Além disso, em Goiânia e Montividiu não houve chuvas uma semana antes da colheita, o que pode explicar a alta contaminação de aflatoxinas encontrada nas amostras provenientes de Jataí. Segundo Scussel (2002), clima chuvoso e colheita de grãos, com umidade elevada, são condições que favorecem a proliferação de fungos.

CONCLUSÃO

1. Todas as amostras analisadas continham grãos ardidos, mas abaixo do limite tolerado pelas indústrias.
2. Houve elevada contaminação por aflatoxinas (B_1 , B_2 e G_2), principalmente nas amostras de grãos provenientes do município de Jataí. Isto, provavelmente, foi devido ao maior índice pluviométrico ocorrido neste município, sobretudo durante a colheita, já que nos outros locais (Goiânia e Montividiu) as chuvas cessaram uma semana antes desta operação.
3. Os níveis de aflatoxinas B_1 e B_2 mostraram-se altamente correlacionados entre si.
4. A contaminação por aflatoxina B_1 tende a ser maior do que por B_2 e G_2 , em todos os locais, com ausência de amostra contaminada por aflatoxina G_1 .
5. As amostras provenientes de Jataí foram as mais infestadas por *Aspergillus*, mas, mesmo naquele local, não houve correlação entre a presença do fungo e a produção de aflatoxinas.

REFERÊNCIAS

ABBAS, H. K. et al. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Protection*, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 1-9, jan. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Teste de sanidade de sementes. In: _____. *Regras para análise de sementes*. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. p. 204-212.

BRASIL. Portaria nº 11, de 12 de abril de 1996. Estabelece critérios complementares para classificação do milho. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, n. 72, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 24 de março de 2000. Métodos analíticos de referência para análise de micotoxinas em produtos, subprodutos e derivados de origem vegetal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 30 mar. 2000, Seção 1, p.35-36.

BROWN, R. L. et al. Living maize embryo influences accumulation of aflatoxin in maize kernels. *Journal of Food Protection*, Des Moines, Iowa, v. 56, n. 11, p. 967-971, 1993.

CHEN, I.; MITCHELL, H. L. Trypsin inhibitors in plants. *Phytochemistry*, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 327-330, 1973.

GLÓRIA, E. M.; FONSECA, H.; SOUZA, I. M. Occurrence of mycotoxins in maize delivered to the food industry in Brazil. *Tropical Science*, Oxford, v. 37, n. 1, p. 107-110, 1997.

GUNTHER, T. M. F.; SUCHARA, E. A.; SCUSSEL, V. M. Avaliação do nível de contaminação por aflatoxinas, zearalenona, esterigmatocistina e ocratoxina A em milho (*Zea mays* L.) cultivado no Estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24, 2002, Florianópolis. *Anais... Sete Lagoas: ABMS/Embrapa Milho e Sorgo/Epagri*, 2002. p.125.

GUO, B. Z. et al. Protein profiles and antifungal activities of kernel extracts from corn genotypes resistant and susceptible to *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection*, Des Moines, Iowa, v. 61, n. 1. p. 98-102, 1998.

GUO, B. Z. et al. Evidence for cutinase production by *Aspergillus flavus* and its possible role in infection of corn kernels. *Phytopathology*, St. Paul, v. 86, n. 8, p. 824-829, 1996.

HAMMERSCHMIDT, R.; NICHOLSON, R. L. Resistance of maize to anthracnose: changes in host phenols and pigments. *Phytopathology*, St. Paul, v. 67, n. 2, p. 251-258, 1977.

HENNIGEN, M. R.; DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul. Brazil. *Food Additives and Contaminants*, London, v. 12, n. 5, p. 677-681, 1995.

HUANG, Z.; WHITE, D. G.; PAYNE, G. A. Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxin biosynthesis. *Phytopathology*, St. Paul, v. 87, n. 6, p. 622-627, 1997.

JONES, B. D. Chemistry of mycotoxins - Aflatoxin and related compounds. In: WYLLIE, T. D.; MOREHOUSE, L. G. (Ed.). *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses: Encyclopedic Handbook* v. 1. Nova York: Marcel Dekker, 1977. p. 131-237.

- JONES, R. K.; DUNCAN, H. E.; PAYNE, G. A.; LENARD, K. J. Factors influencing infection by *Aspergillus flavus* in silk-inoculated corn. *Plant Disease*, American Phytopathological Society, St. Paul, v. 64, n.9, p.859-863, 1980.
- KARANARATNE, A.; WEZENBERG, E.; BULLERMAN, L. B. Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp. *Journal of Food Protection*, Des Moines, Iowa, v. 53, n. 3, p. 230-236, 1990.
- KLUN, J. A. et al. Genetic nature of the concentration of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazine-3(4H)-one and resistance to the European corn borer in a diallel set of eleven maize inbred. *Crop Science*, Madison, v. 10, n. 1, p. 87-90, 1970.
- LAZZARI, F.A.; LAZZARI, S.M.N. Qualidade de grãos: colheita, recebimento, secagem e armazenamento. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 6., 2001. Londrina, *Palestras...* Londrina: IAPAR, 2001, p. 145-172.
- LILLEHOJ, E. B. et al. Aflatoxin contamination of preharvest corn: role of *Aspergillus flavus* inoculum and insect damage. *Cereal Chemistry*, St. Paul, v. 57, n. 4, p. 255-257, 1980.
- LILLEHOJ, E. B. et al. Aflatoxin production in *Aspergillus flavus* inoculated ears of corn grown at diverse locations. *Crop Science*, Madinson, v. 15, n. 2, p. 267-270, 1975.
- MACHINSKI JUNIOR, M. *Micotoxinas em cultivares de milho (Zea mays L.) e em produtos de milho: avaliação da ocorrência e de fatores que contribuem para a produção no campo*. 2000. 185f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)-Universidade de Campinas, Campinas, 2000.
- MARÍN, S. et al. Impact of environment and interactions of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B₁ and aflatoxins on maize grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 81, n. 11, p. 1060-1068, 2001.
- OLIVEIRA, M. A. B. *Aflatoxinas B₁ e G₁ em rações para frangos de corte colhidas em granjas do Estado de Goiás*. 1997. 34 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1997.
- PAYNE, G. A. et al. Effect of temperature on the preharvest infection of maize kernels by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 78, n. 10, p. 1376-1380, 1988.
- PEERS, F. G. et al. Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland. *International Journal of Cancer*, Genebra, v. 39, n. 5, p. 545-553, 1987.
- PRANDINI, A.; TANSINI, G.; SIGOLO, S.; FILLIPI, L., LAPORTA, M., PIVA, G.. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, out. 2007. Disponível em: www.sciencedirect.com.
- RAMAKRISHNA, Y.; BHAT, R.V.; VASANTHI, S. Natural occurrence of mycotoxins in staple foods in India. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 38, n. 9, p. 1857-1859, 1990.
- SABINO, M. et al. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil: Part II. *Food Additives and Contaminants*, London, v. 6, n. 3, p. 327-331, 1989.
- SANTÚRIO, J. M. Micotoxinas: problemas no milho e nos animais. In: _____. *Workshop sobre qualidade do milho*. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 1997. p. 53-63.
- SANTÚRIO, J. M. et al. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações destinados ao consumo animal no Sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7., 1992, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1992. p. 12.
- SCHMITT, S. G.; HURBURGH JUNIOR, C. R. Distribution and measurement of aflatoxin in 1983 Iowa corn. *Cereal Chemistry*, St. Paul, v. 66, n. 3, p. 165-168, 1989.
- SCOTT, G. E.; ZUMMO, N. Preharvest kernel infection by *Aspergillus flavus* for resistant and susceptible maize hybrids. *Crop Science*, Madinson, v. 30, n. 2, p. 381-383, 1990.
- SCUSSEL, V. M. Fatores condicionantes para proliferação de fungos e produção de micotoxinas em grãos. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24., 2002, Florianópolis. *Palestras...* Florianópolis: Sete Lagoas: ABMS/Embrapa Milho e Sorgo/Epagri, 2002.
- THOMPSON, D. L. et al. Aflatoxin concentration in corn as influenced by kernel development stage and postinoculation temperature in controlled environments. *Crop Science*, Madinson, v. 20, p. 609-612, 1980.
- VIQUEZ, O. M. et al. Aflatoxin contamination in corn samples due to environmental conditions, aflatoxin-producing strains, and nutrients in grain grown in Costa Rica. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, American Chemical Society, Washington, v. 42, n. 11, p. 2551-2555, 1994.
- ZERINGUE JUNIOR, H. J. Volatile antifungal compounds in maize kernels: effect of ear position on aflatoxin production. *Journal of AOAC Internacional*, Arlington, v. 80, n. 2, p. 341-344, 1997.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.D. *SANEST: Sistema de análise estatística para microcomputadores*. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1984.
- ZUBER, M. S.; LILLEHOJ, E. B. Status of the aflatoxin problem in corn. *Journal of Environmental Quality*, Madinson, v. 8, n. 1, p. 1-5, 1979.